

「普遍的なウイルスが腫瘍をもたらす謎の解明」

名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学・教授

木村 宏

要旨

Epstein-Barr virus (EBV) は思春期に伝染性単核症をもたらす、成人に至るまでにほぼ 95%が既感染となる普遍的な DNA ウイルスである。また、EBV は様々な B 細胞性腫瘍および T/NK 細胞性腫瘍などリンパ系腫瘍と密接に関連するのみならず、上皮系の細胞にも感染し上咽頭がん・胃がんとも関係が深い。我々は、EBV 関連リンパ腫に対して網羅的遺伝子解析を行い、特定の遺伝子を欠いた EBV が高頻度に認められることを見出した。最も頻度が高かったのはウイルス micro RNA をコードする BART 領域であり、この領域を欠失することにより、腫瘍原性に関わるウイルス遺伝子群が発現誘導され腫瘍化を促進することを明らかにしてきた。本研究では、ウイルス欠失・変異の腫瘍原性に関わる役割を解明するために、対象を EBV 関連リンパ腫のみならず、上皮系の EBV 関連腫瘍に広げて検討した。その結果、EBV 関連腫瘍において EBV 欠失の頻度および部位は疾患ごとに異なること、欠失のみならず点変異による機能喪失も腫瘍化に関与していること、また新たな腫瘍関連領域として C promoter (Cp) と EBNA-3B 遺伝子の存在を明らかにした。

背景・目的

【背景】

Epstein-Barr virus (EBV) は、ヘルペスウイルス科に属し、全長 170kb、約 80 遺伝子をコードする大型の DNA ウイルスである。唾液を介して感染し、時に、小児・若年成人に伝染性単核症を起し、成人に至るまでにほぼ 95%が EBV に既感染となる。EBV は初感染後、リンパ球に潜伏感染し、様々な B 細胞性腫瘍（バーキットリンパ腫・ホジキンリンパ腫・EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫・移植後リンパ増殖症など）および T/NK 細胞性腫瘍（節外性 NK/T リンパ腫・慢性活動性 EBV 病）と密接に関連している¹。本ウイルスはリンパ球のみならず、上皮系の細胞にも感染し、上咽頭がん・胃がん（わが国の胃がんの 1 割は EBV 関連）とも関係が深い。

なぜ、ありふれた EBV が一部の個体にのみ腫瘍を形成するのかは、未解明である。最近、我々は EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患である慢性活動性 EBV 病に対して、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行い、高率に EBV 遺伝子の一部が欠失していることを発見した²。興味深いことに、これらの欠失は慢性活動性 EBV 病のみならず EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫や節外性 NK/T リンパ腫にも認められた。

また、これまでの予備実験により、複数の EBV 遺伝子が EBV 関連リンパ腫において欠失が認められることを見出している。最も頻度が高かったのは micro RNA をコードする BART micro RNA クラスター領域であり、この領域を欠失することにより、腫瘍原性に関わるウイルス遺伝子群が発現誘導され腫瘍化を促進することを、マウスモデルで明らかにしている^{2,4}。

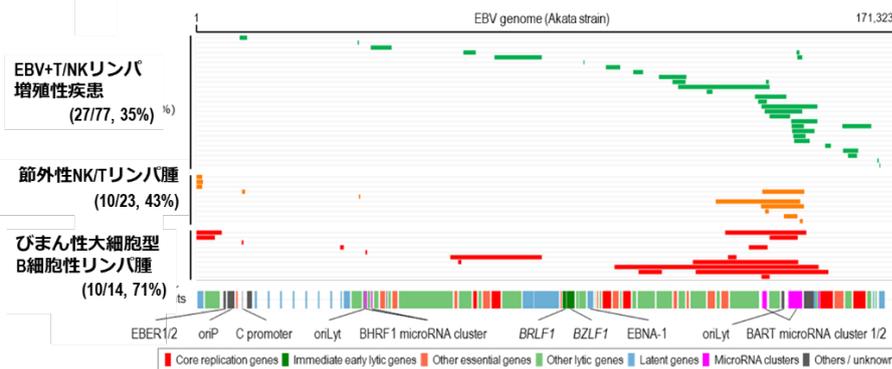


図1. EBV関連リンパ腫におけるウイルス遺伝子欠損（文献2より抜粋）

【目的】

本研究では、EBV 関連リンパ腫のみならず、上皮系の EBV 関連腫瘍に対象を広げて、欠損ウイルスの腫瘍原性に関わる役割を解明する。研究対象である EBV 関連腫瘍の多くは、東アジアやアフリカで頻度の高い疾患であり、欧米での研究は進んでいない。特に我が国をはじめとする東アジアでは、T 細胞性もしくは NK 細胞性のリンパ腫や上咽頭がん、EBV 陽性胃がんの頻度が高いことが知られている。早急に本研究を推進することで、世界に先んじて、普遍的な EBV がなぜ特定の地域において、一部の個体にのみ「がん」を引き起こすのかを解明できる。また、本研究により、遺伝的背景を同じくする集団・民族に高率にがんを発生させる根源的な謎を解き明かす可能性がある。

方法

EBV 関連疾患と健常人に由来する 990 株の EBV ゲノムを、ターゲットキャプチャー法においてリシーケンス解析し、欠失、重複、逆位、ならびにヒトゲノムへの挿入を検出した。対象疾患は、バーキットリンパ腫、ホジキンリンパ腫、EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、移植後リンパ増殖症、節外性 NK/T リンパ腫、慢性活動性 EBV 病、伝染性単核症、その他の EBV 関連血液・腫瘍疾患、EBV 陽性胃がん、上咽頭がんの 10 疾患とした。検体は名古屋大学医学部附属病院、愛知県がんセンター病院、愛知医科大学および久留米大学から集積し、主に種々の EBV 関連腫瘍のホルマリン固定組織、一部は血液を用いた。また、公共データベース上に公開されているゲノム情報も用いた。

高頻度に欠失していた領域を欠く組換え EBV を作成し、ノックアウトした変異ウイルスを作成し、野生型 EBV と比較することで、当該遺伝子の腫瘍化における役割を解明した。組換えウイルスの作成方法と遺伝子機能の解明手順を以下に示す。

1) 変異ウイルス作成：Bacterial artificial chromosome (BAC) を用い、該当する遺伝子/エレメントを欠失した組換えウイルスを作成した⁵。BAC システムにより作製した組換えウイルスは、上皮系細胞での解析は容易である一方、B 細胞には感染しにくいという欠点がある。よって、B 細胞では、EBV が潜伏感染している既存の EBV 陽性細胞株を用い、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いた^{6,7}。

2) 細胞を用いた in vitro 機能解析：得られた変異 EBV を種々の細胞株およびヒト初代 B 細胞に感染させ、その感染率・不死化能・潜伏感染率などを野生株と比較した。次いで、RNA シーケンシングにより宿主及びウイルス遺伝子発現解析を行い、野生型との比較により、欠失 EBV 感染細胞で発現が変化した遺伝子を探索し、その機能を解析した。さらに、細胞株・ヒト初代 B 細胞に感染させた後に、経時的

にシングルセル RNA シーケンシングを実施するなど、感染細胞のウイルス/宿主遺伝子発現の動態を解析した。

3) マウス異種移植モデルを用いた *in vivo* 機能解析：ヒト B 細胞に EBV を感染させ B 細胞株を作成した。免疫不全マウスである NOG マウスの腹腔内に、EBV 陽性 B 細胞株を投与しリンパ腫を発生させた。EBV 陽性腫瘍細胞の動態・臓器浸潤、転移について欠失ウイルスと野生型を比較することで欠失遺伝子の役割を解明した^{5,8}。また、腫瘍組織を用い、RNA シーケンシングにより宿主及びウイルス遺伝子の発現解析を行った⁹。

結果

1) EBV 関連 10 疾患および健常人について、EBV 全ゲノム解析を行い、まず大きな欠失について検討した。欠失はすべての疾患に認められたものの頻度は疾患ごとに異なっていた。EBV ゲノムの欠失は、慢性活動性 EBV 病 (27%) や、血液悪性疾患 (EBV 陽性びまん性大細胞型リンパ腫 [44%]、節外性 NK/T 細胞リンパ腫 [39%]) で高頻度である一方、伝染性単核球症 (11%) や移植後リンパ増殖性疾患(7%)、あるいは上皮性悪性腫瘍 (胃癌 [4%]、上咽頭癌 [5%]) においては低頻度であった。欠失の長さにも違いがあり、血液悪性疾患では平均 1,000 塩基を超える欠失が存在するが、他の疾患においては 1,000 塩基未満の欠失が大半であった。BART microRNA クラスターは、血液悪性疾患において高頻度に欠失していたが、上皮性悪性腫瘍や健常人においてはほとんど欠失が見られなかった。また、新たな欠失の標的として、C promoter (Cp) 領域と EBNA-3B 遺伝子を特定した。EBV ゲノムのヒトゲノムへの挿入は 3 株において検出された。3 株はいずれもバーキットリンパ腫由来である点が共通していたが、両ゲノムにおける接合点は株ごとに異なっていた。

2) さらに、点変異について解析したところ、塩基置換を伴う収斂変異 (系統解析と相関せず進化の過程で 2 回以上獲得されたもの) が、複数の EBV 遺伝子に集積していた。そのうちの一つは EBNA-3B であり、変異は機能ドメインに集中し、機能喪失型変異が疑われた。

3) EBV 陽性びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫や節外性 NK/T リンパ腫など EBV 関連リンパ腫では、EBV の Cp 領域の欠損が高頻度に認められることを見出した。そこで、Cp 領域を失った組換えウイルスおよび対照として野生株ウイルスを作成した。Cp の欠損は、*in vitro* では B 細胞への形質転換効率を上昇させ、*in vivo* では EBV 関連リンパ腫の病勢進行を早めることを明らかとした (図 2, 3)¹⁰。

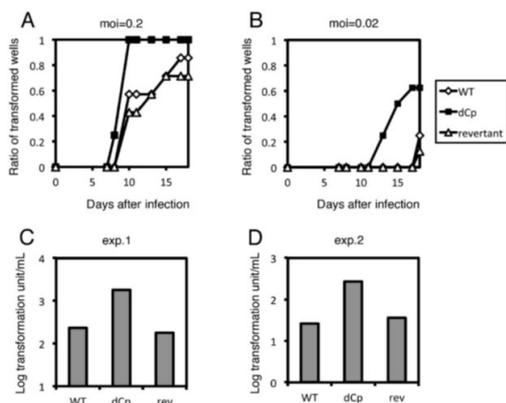


図2. Cp欠損株と野生株の増殖性および不死化効率の比較(文献10より抜粋)

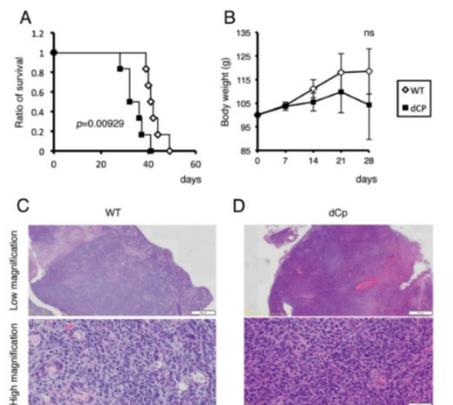


図3. マウス異種移植モデルによるCp欠損株と野生株のリンパ腫原性の比較(文献10より抜粋)

Cp が欠失することにより、ウイルスがん遺伝子の一つである LMP2A の発現が亢進され、形質転換を促進していると考えられた。また、形質転換においては、LMP2A が細胞増殖の促進とアポトーシスの阻害を起こすという報告があることから、Cp 欠損がリンパ腫形成促進に直接関与している可能性がある。

4) 次に、欠失した EBV がどのように腫瘍原性を増すのかを調べるために、溶解感染遺伝子の下流のウイルス遺伝子について検討した。BNRF1 はウイルス粒子の構成成分であるテグメントタンパク質の主成分であり、染色体の過複製や多極有糸分裂に関与している。この BNRF1 が腫瘍形成にどのように関わるのかは今まで明らかではなかった。我々は BNRF1 欠損ウイルスを作成し、その性状について調べた。欠損ウイルスを感染させ樹立した細胞株は、細胞死を起こしやすく、免疫不全マウスを用いた異種移植モデルでも、腫瘍形成の著しい低下が見られた (図 4, 5)¹¹。

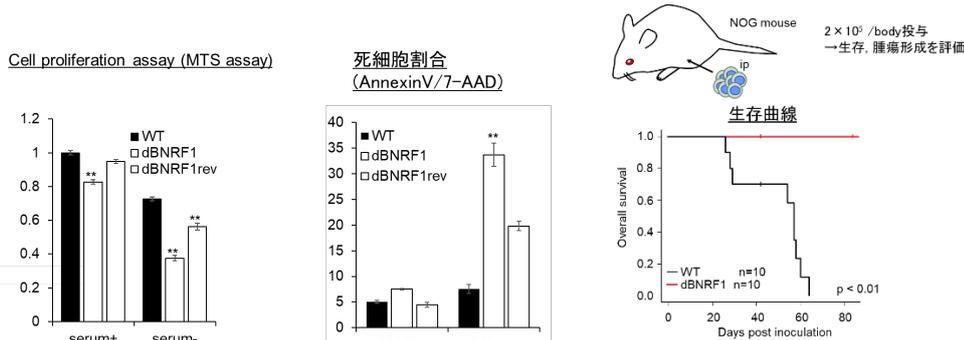


図4 BNRF1欠損EBV陽性B細胞株は細胞死を起こしやすい

図5 BNRF1欠損EBV陽性B細胞はin vivoにおいて腫瘍形成能が低下している

一方、BNRF1 はアポトーシス誘導に関与している IFI27 の発現増強を惹起することが知られている。IFI27 をノックダウンしたところ、マウスモデルでの病原性が低下したため BNRF1-IFI27 axis は、EBV 陽性 B 細胞腫瘍の生存・増殖効率を高め腫瘍形成に寄与していると考えている。

考察

EBV 関連疾患と健常人に由来する 990 株の EBV ゲノムを、ターゲットキャプチャー法においてリシーケンス解析し、欠失、重複、逆位ならびに点変異を検出した。EBV ゲノムの欠失は血液悪性疾患で高頻度である一方、伝染性単核症や移植後リンパ増殖性疾患、および上皮性悪性腫瘍においては低頻度であった。BART microRNA クラスターは、血液悪性疾患において高頻度に欠失していたが、上皮性悪性腫瘍や健常人においてはほとんど欠失が見られなかった。BART microRNA クラスターの欠損は、ウイルスの溶解感染遺伝子群の発現を亢進することが明らかにされている^{4,12}。

活性化された一群のウイルス遺伝子には、細胞死回避や細胞増殖を促したり、ゲノム不安定性を増したりして、腫瘍化能を高めるものがある。今回、機能解析した BNRF1 もそうした溶解感染遺伝子群の発現の一つであり、従来は染色体の過複製などゲノム不安定性に関与すると考えられてきた。一方、我々の検討では、IFI27 の発現増強を介し、細胞腫瘍の生存・増殖効率を高め腫瘍形成に寄与していることが示唆された。すなわち、BART

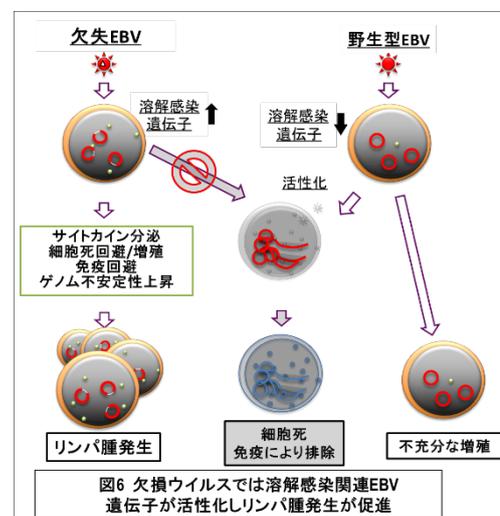


図6 欠損ウイルスでは溶解感染関連EBV遺伝子が活性化しリンパ腫発生が促進

microRNA クラスターなどの欠損は、BNRF1 から溶解感染関連遺伝子群の発現亢進を介して、細胞死回避や細胞増殖を促すことにより、腫瘍化をもたらしていると考えている (図 6)^{2,4,12}。

また、新たな欠失の標的として、Cp と EBNA-3B 遺伝子を特定した。Cp が欠失することにより、ウイルスがん遺伝子の一つである LMP2A の発現が亢進され、形質転換を促進していると考えている。EBNA-3B においては、欠失ウイルスはウイルス特異的細胞性免疫の誘導能が低いため、*in vivo* の腫瘍形成能が高まることが既に報告されている¹³。これらの腫瘍化促進機構は、BART microRNA クラスター欠損による溶解感染関連遺伝子誘導とは明らかに異なるメカニズムと考えられた。

以上より、EBV 関連腫瘍において、EBV 遺伝子欠失は高頻度に認められるものの、欠失の頻度および部位は疾患ごとに異なること、欠失のみならず点変異による機能喪失も腫瘍化に関与していること、また新たな腫瘍関連遺伝子として Cp と EBNA-3B の存在を明らかにした。欠失・変異ウイルスが、多様なメカニズムで感染細胞の腫瘍化を促進していると考えている。また、欠失・変異の起こるタイミングについては、経時的に観察した株が少ないために、推測の域を出ない。しかしながら、全く増殖能を欠いている欠失株も見られることから、欠失・変異株が他の個体に感染するのではなく、個体内で偶然現れた欠失・変異株が、ある細胞に感染・潜伏し、それ以上のウイルス産生はできないものの、感染した細胞が増殖の優位性、細胞性免疫からの回避能、ゲノム不安定性による宿主遺伝子変異誘導が起こり感染細胞が腫瘍化していくと考えている。一方、感染細胞の性質や微小環境によって、そのメカニズムが異なることは容易に想像できる。このような欠失・変異ウイルスによる腫瘍促進については、これまで HTLV-1 など他の腫瘍ウイルスについては多く報告されてきたが^{14,15}、EBV ではまとまった報告は初めてである。がんウイルスによる腫瘍化メカニズムは複雑で多様であるが、欠失ウイルスの存在も腫瘍化の要因であり、これこそが、ありふれたウイルスがごく一部の個体にのみ腫瘍をもたらす原因の一つではないかと考えている。

共同研究者

奥野 友介 名古屋市立大学大学院医学研究科ウイルス学・教授
川田 潤一 名古屋大学医学部附属病院小児科・准教授

引用論文

1. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1720-1748.
2. Okuno Y, Murata Y, Sato Y, et al. Defective Epstein-Barr virus (EBV) in chronic active EBV infection and EBV-related hematological malignancy. *Nat Microbiol*. 2019 Mar;4(3):404-413.
3. Murata T, Okuno Y, Sato Y, et al. Oncogenesis of CAEBV revealed: intragenic deletions in the viral genome and leaky expression of lytic genes. *Rev Med Virol*. 2020 Mar;30(2):e2095.
4. Kimura H, Okuno Y, Sato Y, et al. Deletion of Viral microRNAs in the Oncogenesis of Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoma. *Front Microbiol*. 2021 Jul 8;12:667968.

5. Sato Y, Watanabe T, Suzuki C, et al. S-like-phase Cyclin-Dependent Kinases stabilize the Epstein-Barr virus BDLF4 protein to temporally control late gene transcription. *J Virol*. 2019 Apr 3;93(8). pii: e01707-18.
6. Hara Y, Watanabe T, Yoshida M, et al. Comprehensive Analyses of Intraviral Epstein-Barr Virus Protein-Protein Interactions Hint Central Role of BLRF2 in the Tegument Network. *J Virol*. 2022 Jul 27;96(14):e0051822.
7. Uddin MK, Watanabe T, Arata M, et al. Epstein-Barr virus BBLF1 mediates secretory vesicle transport to facilitate mature virion release. *J Virol*. 2023 May 17:e0043723.
8. Miyagi S, Watanabe T, Hara Y, et al. A STING inhibitor suppresses EBV-induced B cell transformation and lymphomagenesis. *Cancer Sci*. 2021 Dec;112(12):5088-5099.
9. Ding W, Wang C, Narita Y, et al. The Epstein-Barr Virus Enhancer Interaction Landscapes in Virus-Associated Cancer Cell Lines. *J Virol*. 2022 Sep 28;96(18):e0073922.
10. Mabuchi S, Hijioka F, Watanabe et al. Role of Epstein-Barr virus C promoter deletion found in diffuse large B cell lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2021 Feb 1;13(3):561.
11. Sagou K, Sato Y, Okuno Y, Watanabe T, Inagaki T, Motooka Y, Toyokuni S, Murata T, Kiyoi H, Kimura H. Epstein-Barr virus lytic gene BNRF1 promotes B-cell lymphomagenesis via IFI27 upregulation. *PLoS Pathog*. 2024 Feb 1;20(2):e1011954.
12. Munz, C., Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 2019. 17(11): p. 691-700.
13. White RE, Rämer PC, Naresh KN, et al. EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. *J Clin Invest*. 2012 Apr;122(4):1487-502.
14. Moore, P.S. and Y. Chang, Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer*, 2010. 10(12): p. 878-89.
15. Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A et al, Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet*, 2015. 47(11): p. 1304-15.

助成研究に関連した発表論文

1. Kimura H, Okuno Y, Sato Y, et al. Deletion of Viral microRNAs in the Oncogenesis of Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoma. *Front Microbiol*. 2021 Jul 8;12:667968.
2. Miyagi S, Watanabe T, Hara Y, et al. A STING inhibitor suppresses EBV-induced B cell transformation and lymphomagenesis. *Cancer Sci*. 2021 Dec;112(12):5088-5099.
3. Sato Y, Yaguchi M, Okuno Y, et al. Epstein-Barr virus tegument protein BGLF2 in exosomes released from virus-producing cells facilitates de novo infection. *Cell Commun Signal*. 2022 Jun 21;20(1):95.
4. Suzuki T, Sato Y, Okuno Y, et al. Genome-wide CRISPR screen for HSV-1 host factors reveals PAPSS1 contributes to heparan sulfate synthesis. *Commun Biol*. 2022 Jul 19;5(1):694.

5. Uddin MK, Watanabe T, Arata M, et al. Epstein-Barr virus BBLF1 mediates secretory vesicle transport to facilitate mature virion release. *J Virol.* 2023 May 17:e0043723.
6. Sugimoto A, Watanabe T, Matsuoka K, et al. Growth Transformation of B cells by Epstein-Barr Virus Requires IMPDH2 Induction and Nucleolar Hypertrophy. *Microbiol Spectr.* 2023 Aug 17;11(4):e0044023. doi:
7. Sagou K, Sato Y, Okuno Y, et al. Epstein-Barr virus lytic gene BNRF1 promotes B-cell lymphomagenesis via IFI27 upregulation. *PLoS Pathog.* 2024 Feb 1;20(2):e1011954.
8. Kimura H, Murata T. Understanding the Role of EBV Infection in Lymphomagenesis; Precision Cancer Therapies vol 2. O'Connor OA ed, Wiley-Blackwell, p 235-245, 2024